

# UNIVERSITÀ DI PISA



## DIPARTIMENTO DI FARMACIA

*Corso di Laurea Specialistica in Chimica e  
Tecnologia Farmaceutiche*

Tesi di Laurea:

### **PROGETTAZIONE E SINTESI DI MODULATORI ALLOSTERICI DEL RECETTORE CANNABINOIDE CB1**

**Relatori:** *Prof.ssa Clementina Manera*

**Candidata:** *Sara Nencini*

*N° matricola 441646*

*Dott.ssa Francesca Gado*

Settore Scientifico Disciplinare: **CHIM – 08**

ANNO ACCADEMICO 2015 – 2016

# Indice

## **Introduzione generale**

- Storia della cannabis 1
- Descrizione botanica 3
- Cannabinoidi 6
- Sistema endocannabinoide 8
  - Recettori cannabinoidi 9
  - Endocannabinoidi 13
  - Biosintesi e catabolismo degli endocannabinoidi 14
- Meccanismi di trasduzione del segnale 17
- Ligandi di sintesi dei recettori cannabinoidi 21
- Usi terapeutici 30

## **Introduzione alla parte sperimentale** 34

- Derivati del PSNCBAM-1 42

## **Parte sperimentale** 55

## **Bibliografia** 75

# Introduzione generale

## Storia della cannabis

La Cannabis è una delle più antiche piante psicoattive mai conosciute. Nel corso della storia, dall'Asia all'Europa, dalle Americhe all'Africa, milioni di uomini hanno sfruttato le sue fibre come materia prima per i tessuti e la carta, hanno usato i suoi semi per la produzione di olio e combustibile ed hanno apprezzato i suoi principi attivi per scopi medici e religiosi. Per quanto concerne gli usi medici, essi furono approfonditi dai Cinesi che ne trascurarono però gli effetti provocati dalla sua assunzione. Essi l'assumevano in forma di decotto per curare dolori interni di vario tipo come la stipsi, gotta e reumatismi; inoltre la fumavano per alleviare il mal di denti e per curare lacerazioni del cavo orale. In Italia l'inizio della coltivazione della canapa (esclusivamente a scopo tessile) è legato all'espansione delle repubbliche marinare, nelle quali era utilizzata per la fabbricazione di corde e vele per le navi da guerra. Solo successivamente, le molteplici proprietà della canapa furono sfruttate nell'uso domestico e per la produzione di oggetti di artigianato che ancora oggi si trovano sul mercato (per esempio le tovaglie di canapa tipiche della Romagna). In Europa, invece, l'uso della canapa come psicotropo inebriante ha cominciato a diffondersi in seguito alla campagna d'Egitto di Napoleone del 1798. I suoi soldati non trovando alcolici cominciarono ad assumere hashish e la portarono con loro nel rientro in patria. Si tratta di una diffusione comunque assai modesta, restando l'uso ricreativo confinato in ambiti molto ristretti. Lo stesso può dirsi della sua diffusione negli Stati Uniti dove, dove l'uso a fini ricreativi era pressochè sconosciuto ai "bianchi", essendo, ancora agli inizi del Novecento, patrimonio quasi esclusivo delle minoranze messicane e afroamericane. Proprio in virtù di questa sua scarsa diffusione di uso, fino agli inizi del secolo scorso la Cannabis non ha destato particolari clamori. A partire dai primi anni del 1900, però, il consumo di alcune droghe comincia ad essere percepito come un'azione immorale. Quest'idea nasce negli Stati Uniti, in modo sorprendentemente repentino, per poi propagarsi, altrettanto rapidamente oltreoceano.

Le prime sostanze ad essere proibite sono i derivati dell'oppio e la cocaina. Inizialmente, dunque, la Cannabis sembra resistere all'ondata proibizionista. Tuttavia con l'approvazione del *Marihuana Tax Act* nel 1937, anche la cannabis finisce nella "lista nera" delle sostanze proibite. La canapa diventa quindi improvvisamente una droga pericolosa e, nel giro di pochi anni, si rafforza l'idea che i suoi derivati siano addirittura la via d'accesso privilegiata alla "tossicodipendenza" e al consumo di eroina e cocaina. Questa nuova fase, inevitabilmente coinvolgerà non soltanto le vicende della "Cannabis droga", ma anche quelle della "Cannabis farmaco". L'uso quindi non medico dei derivati della Cannabis comincia ad essere severamente punito, ma in tempi molto brevi ciò arriva a coinvolgere direttamente anche l'uso terapeutico. Le case farmaceutiche vi si allontanarono tra il diciannovesimo e ventesimo secolo poiché si diressero verso l'oppio e nuovi analgesici sintetici, tanto che nel 1941 la Cannabis scompare dalla farmacopea statunitense. È così che il *Marijuana Tax Act* non condizionò soltanto drasticamente la storia futura della Cannabis come droga e come farmaco, ma ne impedì anche lo studio in ambito scientifico, proprio in una fase in cui le potenzialità terapeutiche della pianta cominciavano ad attrarre l'interesse di diversi medici e ricercatori. In Europa, invece, il regime fascista la mise al bando come "droga dei negri e nemici della razza" e piano piano questa pianta assunse solo un aspetto negativo fino a rimanere soltanto una droga d'abuso. Negli ultimi anni però, in seguito a numerosi studi, l'utilizzo della Cannabis a scopo terapeutico è stato tutelato, tanto che farmaci da essa ottenuti sono ora in commercio.<sup>1,2</sup>

## Descrizione botanica

La Cannabis è una pianta arbustiva a ciclo annuale, originaria dell'Asia centrale e occidentale, ma coltivata da tempi immemorabili in vari parti del globo. Cresce spontaneamente o può essere coltivata in aree temperate e tropicali (Figura 1).

La tassonomia include la Cannabis nella famiglia delle *Cannabacee* o *Cannabinacee*, ordine *Urticales* (piante sia legnose che erbacee con fiori poco appariscenti). Le prime classificazioni botaniche della Cannabis risalgono al XVIII secolo dove il primo botanico/naturalista a parlarne fu Carl Linnaeus, che considera l'intero genere della Cannabis come una singola specie indivisa: la *Cannabis sativa* L. Successivamente un altro botanico del tempo, D.E Janichewsky distinse tre specie:

- *Cannabis sativa* (volg. Canapa), alta fino a 3 metri e dalla forma piramidale;
- *Cannabis indica* (volg. Canapa indiana), più bassa della precedente e con un maggior numero di rami e foglie;
- *Cannabis ruderalis* (volg. Canapa russa, ruderale o americana), alta al massimo mezzo metro e priva di rami.

In ultimo i canadesi Small e Conquist ripresero la classificazione di Linneo, definendo una sola specie di cannabis, presentante delle varianti: *c.sativa* (usata per fibra e olio) e una varietà indiana *c.indica* (usata per la resina dalla quale si estraggono i cannabinoidi).<sup>3</sup>

La cannabis è un'erba dioica a fusti eretti di 2-3 metri, più o meno ramificati e ispidi. Le foglie sono picciolate, per lo più alterne, palmato-composte con 5-7 segmenti ineguali, lanceolati, ellittici e dentati. Al microscopio sono visibili dei peli di rivestimento unicellulari, ricurvi, con apice appuntito, di cui alcuni mostrano la parte basale ingrossata, contenente cistoliti (depositi di carbonato di calcio). Sono presenti anche peli ghiandolari (tricomi) costituiti da uno stipite pluricellulare, più o meno lungo, e da una testa pluricellulare globosa di 8-6 cellule. È da queste ghiandole, poco numerose sulle foglie e particolarmente abbondanti sulle brattee delle infiorescenze femminili, che si ricava la resina ricca di principi attivi (cannabinoidi di interesse farmacologico). Il frutto è una noce di 2,5-3,5 mm di lunghezza, liscia, grigiastra che matura in autunno e contiene solitamente un solo seme. I

mancono di petali. I fiori maschili portanti lo stame, sono riuniti in racemi ascellari, con 5 sepali e 5 stami. I fiori femminili portanti i pistilli sono riuniti in spighe glomerulate, disposte a coppie all'ascella di una brattea; sono costituiti da un calice urceolato che circonda l'ovario uniovulato. È dal calice che in caso di fecondazione comincia a formarsi il seme. Il fiore compare l'estate e l'impollinazione avviene ad opera del vento.

Nella canapa sono stati evidenziati numerosi composti: un olio essenziale, flavonoidi, zuccheri, acidi grassi, composti fenolici, diidrostilbeni, composti azotati e i cannabinoidi. Quest'ultimi presenti appunto sulle foglie, e soprattutto sulle brattee delle infiorescenze femminili dove si trovano le ghiandole contenenti la resina, vengono classificati in funzione della loro struttura e se ne conoscono circa settanta.

I principali sono il cannabidiolo, il cannabinolo e il tetraidrocannabinolo. Per poterli estrarre è necessario sfregare i tricomi per far fuoriuscire la resina.<sup>4,5</sup>



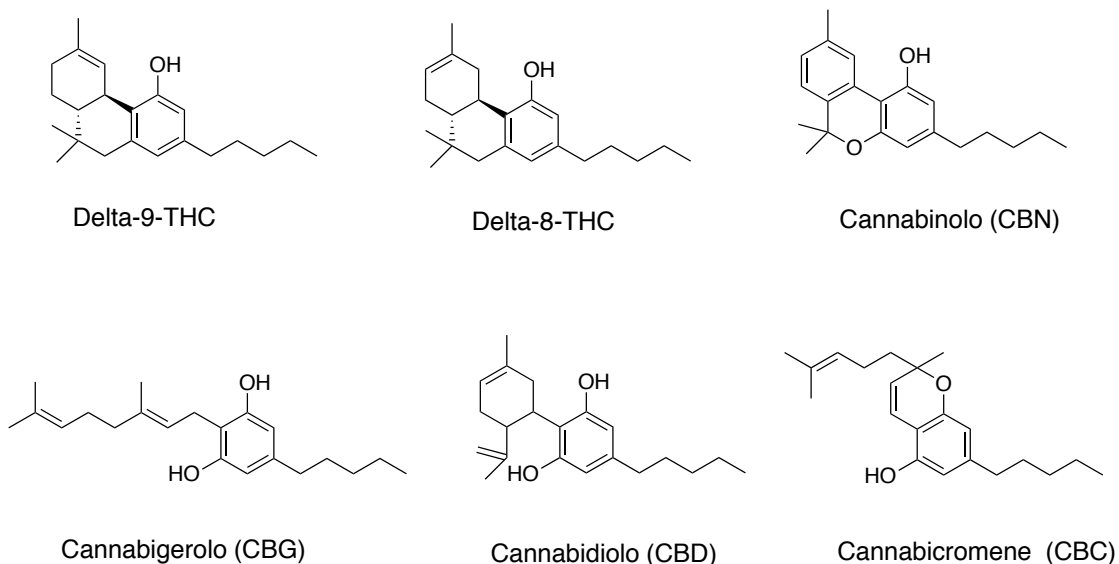
**Figura 1.** Illustrazione di cannabis sativa.

Il termine cannabinoidi si riferiva in passato al gruppo di composti con tipica struttura C<sub>21</sub> presenti nella *Cannabis sativa*. La moderna definizione, basata maggiormente sulla chimica sintetica e sulla farmacologia, comprende strutture affini, o ogni altro composto che interagisca con i recettori cannabinoidi. È stato proposto di utilizzare il termine *fitocannabinoidi* per i composti naturali-vegetali; mentre *endocannabinoidi* per i composti naturali-umani ed i ligandi endogeni dei recettori cannabinoidi.

I fitocannabinoidi naturali sono idrocarburi aromatici contenenti ossigeno.<sup>6</sup>

I principali sono (Figura 2):

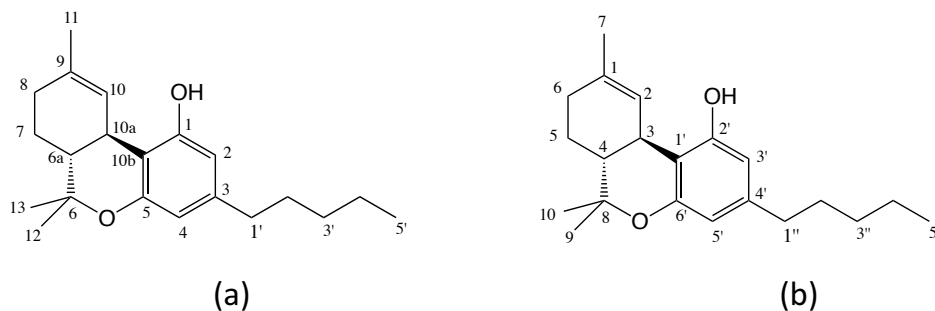
- $\Delta^9$ -Tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC)
- $\Delta^8$ -Tetraidrocannabinolo ( $\Delta^8$ -THC)
- Cannabinolo (CBN)
- Cannabidiolo (CBD)
- Cannabigerolo (CBG)
- Cannabicromene (CBC)



**Figura 2.** Immagine dei principali fitocannabinoidi.



Tra i fitocannabinoidi, il composto principale dotato di attività biologica è il *delta-9-tetraidrocannabinolo* (abbreviato  $\Delta^9$ -THC). Esso è responsabile dell'attività psicotropa riscontrata durante l'assunzione di cannabis.<sup>6</sup> Il  $\Delta^9$ -THC è un olio viscoso rosso-marroncino, concentrato nella resina della pianta. I cannabinoidi strutturalmente correlati al THC possono essere considerati dei dibenzopirani sostituiti, oppure dei terpenoidi sostituiti, ciò che cambia è la numerazione chimica (Figura 3). In pratica è usata esclusivamente la numerazione dibenzopiranic.



**Figura 3.** Numerazione dibenzopiranic (a) e terpenoide (b).

## Sistema Endocannabinoide

Il Sistema Endocannabinoide (ECS) è un complesso sistema biochimico che svolge importanti funzioni regolatorie in tutto il corpo ed è coinvolto in un numero sempre crescente di processi fisiologici e patologie.<sup>7</sup> Il Sistema Endocannabinoide ha infatti un ruolo importante nei processi fondamentali dello sviluppo. Il rilascio dei cannabinoidi endogeni controlla la plasticità sinaptica, ovvero, la capacità del sistema nervoso di modificare l'efficienza del funzionamento delle connessioni tra neuroni (sinapsi), di instaurarne di nuove e di eliminarne alcune in molte aree cerebrali comprese la neocorteccia, l'ippocampo, il cervelletto, e i gangli della base. Il signaling endocannabinoide ha un ruolo fondamentale nelle sinapsi con un chiaro continuum d'azione, dallo stabilirsi delle sinapsi nell'inizio del neurosviluppo, alla funzione delle sinapsi nel cervello adulto. Il sistema endocannabinoide, infatti, è presente nel Sistema Nervoso Centrale fin dalle prime fasi di sviluppo cerebrale, ed esso possiede un ruolo rilevante nell'organizzazione cerebrale durante la vita pre e

neurosviluppo. Essi sono coinvolti nel controllo della neurogenesi, nella proliferazione dei progenitori neurali, nella migrazione e nella specificazione fenotipica dei neuroni immaturi, influenzando la formazione di complessi network neuronali.<sup>8</sup>

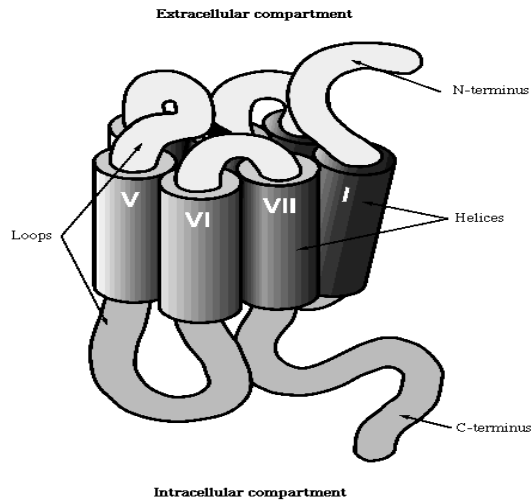
Il Sistema Endocannabinoide è costituito da:

- recettori cannabinoidi CB1 e CB2;
- endocannabinoidi;
- enzimi deputati alla biosintesi e catabolismo di questi ligandi.

## *Recettori Cannabinoidi*

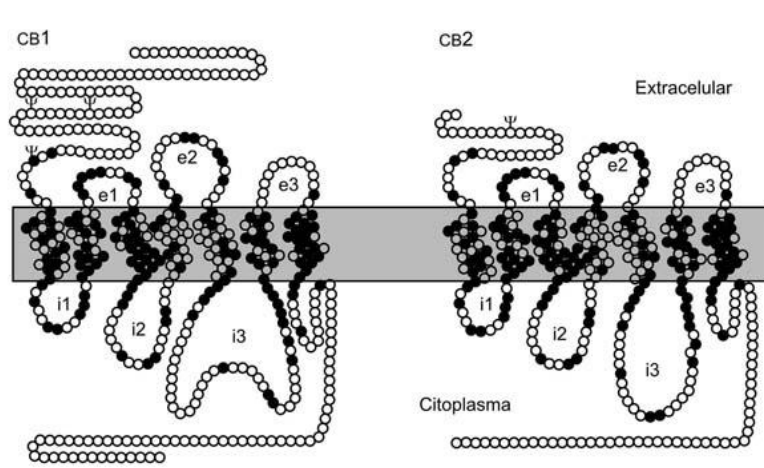
I recettori cannabinoidi vengono così definiti in quanto rispondono a sostanze derivanti dalla cannabis ed altri composti ad essi strutturalmente correlati. Dalla scoperta del principale componente psicoattivo dei preparati a base di cannabis, ovvero del  $\Delta^9$ -THC (avvenuta nel 1964)<sup>9</sup>, solo agli inizi degli anni '90 si giunse all'identificazione e alla caratterizzazione molecolare del primo recettore cannabinoide, denominato CB1.<sup>10</sup>

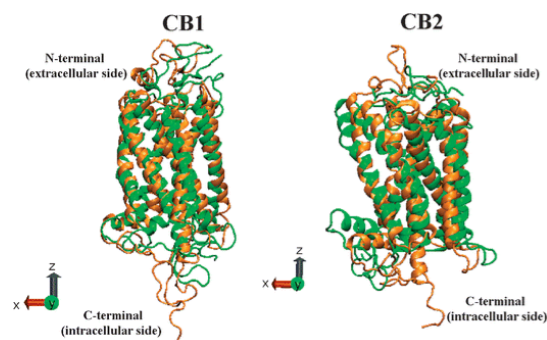
I recettori cannabinoidi sono una classe di recettori accoppiati alle proteine G. Presentano un'unica catena polipeptidica che attraversa per 7 volte la membrana plasmatica portando la porzione ammino-terminale sul versante extracellulare e quella carbossilica su quello intracellulare. Oltre ai 7 domini transmembrana sono presenti 3 loops intracellulari e 3 extracellulari<sup>11</sup> (Figura 5).



**Figura 5.** Struttura dei recettori CB.

I principali recettori cannabinoidi sono il recettore CB1 e il recettore CB2 che fu scoperto successivamente (Figura 6). Il recettore CB1 è stato clonato dalla corteccia cerebrale di ratto<sup>12</sup>, da cervello e testicoli umani<sup>13</sup> e dal cervello di topo<sup>14</sup>. Esso mostra un'omologia nella sequenza aminoacidica tra le specie, che va dal 97% al 99%. Il recettore CB1 umano (hCB1) è costituito da una catena polipeptidica di 472 amminoacidi (473 nel ratto e nel topo). Una variante del recettore CB1 è stata isolata anche dal polmone umano ed è stata denominata CB<sub>1A</sub>.<sup>15</sup>



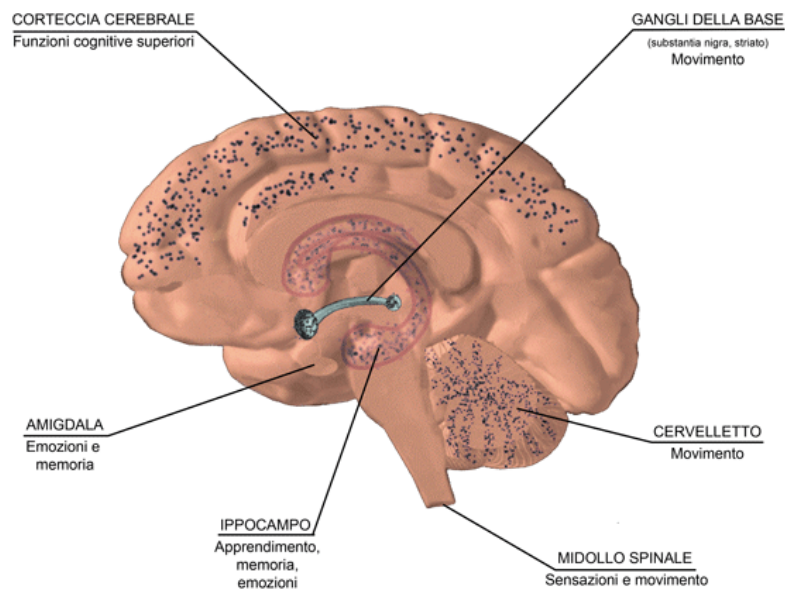


**Figura 6.** Immagine dei recettori cannabinoidi CB1 e CB2.<sup>16</sup>

Il recettore CB2 è stato invece clonato da cellule leucemiche umane HL-60 (human promyelocytic leukaemia cells)<sup>17</sup> ed è costituito da una sequenza di 360 aminoacidi e presenta anch'esso sette domini transmembranalici. Il recettore CB2 rispetto all'hCB1, presenta un dominio ammino-terminale più corto, dove non vi è sostanziale conservazione. L'omologia nella sequenza aminoacidica tra CB1 e CB2 è del 68% per quanto riguarda i domini transmembranalici, e solo del 44% per quanto riguarda la totalità della proteina.<sup>17</sup> L'attivazione del recettore porta all'inibizione dell'adenilato ciclasi. Il recettore CB1 modula anche canali ionici, inducendo ad esempio, l'inibizione dei canali del  $\text{Ca}^{+2}$  e l'attivazione di quelli del  $\text{K}^{+}$ . I cannabinoidi hanno anche dimostrato di modulare diverse vie di segnalazione che sono più direttamente coinvolte nel controllo della proliferazione cellulare e della sopravvivenza, tra cui chinasi segnale-regolata extracellulare (ERK), MAP-chinasi (MAPK), fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K)/Akt.<sup>18,19</sup>

I recettori CB1 sono predominanti nell'encefalo (Figura 7), e la loro attivazione produce effetti sulla circolazione e la psiche, simili a quelli causati dall'ingestione di cannabis, cosa che non avviene con la stimolazione dei recettori CB2. Essi si trovano principalmente a livello delle terminazioni nervose di encefalo, midollo spinale e sistema nervoso periferico dove inibiscono il rilascio di altri neurotrasmettitori, ma sono presenti anche in alcuni organi e tessuti periferici tra cui ghiandole endocrine, leucociti, milza, cuore, apparato riproduttivo,

sovrastimolazione o sovrainibizione da parte di neurotrasmettitori. Nell'encefalo sono espressi particolarmente in quelle regione responsabili del movimento (gangli basali, cervelletto), della modulazione del dolore (alcune zone del midollo spinale, sostanza grigia periacquiduttale)<sup>6</sup> e del comportamento alimentare<sup>20</sup>. Riguardo a quest'ultimo vanno citate due aree, il *mesolimbico* dove vengono modulati la gratificazione e il piacere derivati non solo dall'assunzione di cibo appetitoso ma anche di alcool, nicotina e di alcune droghe, *ipotalamo*, nei nuclei del quale sono localizzati i neuroni che producono neuropeptidi anoressizzanti ed oressizzanti in grado di controllare l'apporto alimentare.<sup>20</sup> La loro espressione invece a livello del tronco encefalico è bassa, il che può spiegare la mancanza di mortalità acuta cannabis-correlata.<sup>6</sup>



**Figura 7.** Distribuzione dei recettori CB1 nel cervello. Le aree indicate con i puntini neri sono quelle in cui maggiormente si lega il cannabinoide esogeno THC. Fonte: NIDA.

immunocompetenti, tra cui i leucociti, la milza e le tonsille, il midollo osseo ematopoietico ma anche nel pancreas.<sup>8</sup> Recentemente basse concentrazioni sono state identificate anche nel SNC, in particolare sulle cellule gliali e microgliali.<sup>21</sup> Tali recettori quindi, svolgono un'attività immunomodulatoria attraverso il rilascio di citochine, molecole proteiche responsabili delle risposte infiammatorie.<sup>8</sup> Recentemente, oltre ai recettori CB1 e CB2, sono stati trovati altri recettori in grado di interagire con il Sistema Endocannabinoide. Tra questi citiamo il GPR119 (espresso principalmente nel tratto digestivo) e il GPR55 (espresso principalmente nel SNC e nelle ossa), che appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G; mentre il TRPV1 o recettore vanilloide di tipo 1 (localizzato soprattutto nel SNC) è un canale cationico non selettivo.

Quest'ultimo è stato ampiamente studiato per il coinvolgimento nella nocicezione. Studi recenti suggeriscono un'intensa interazione tra sistemi vanilloidi e endocannabinoidi in diverse funzioni comportamentali fra cui l'ansia.<sup>22</sup> Il recettore TRPV1 non è identificato come un recettore per i cannabinoidi poiché non è attivato da molecole che agiscono a livello di tale sistema.<sup>18</sup>

## Endocannabinoidi

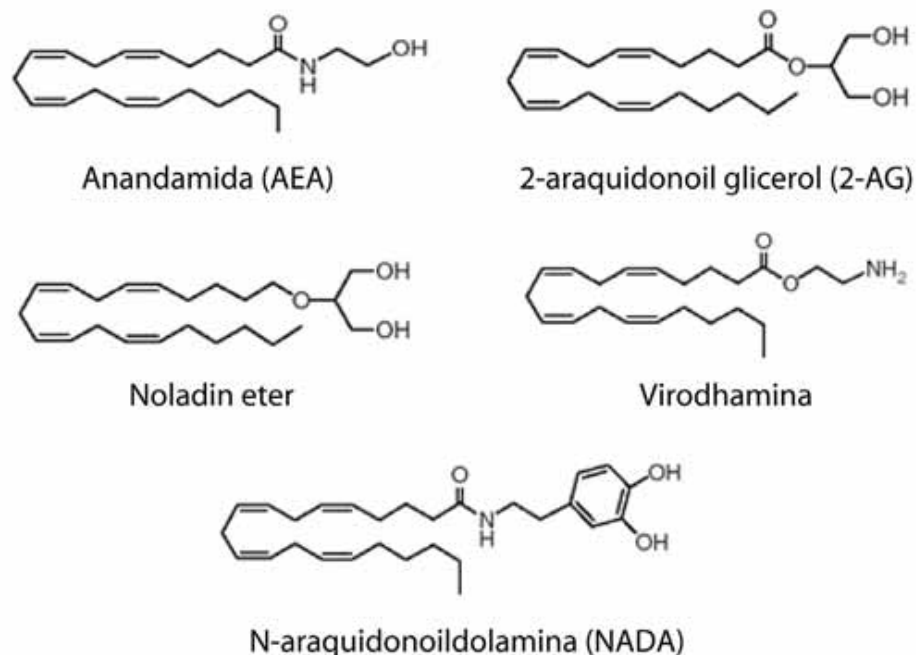
L'identificazione dei recettori cannabinoidi fu seguita dalla scoperta dei loro ligandi endogeni: gli *endocannabinoidi*. Nell'encefalo gli endocannabinoidi agiscono come neuromodulatori. Tutti gli endocannabinoidi sono derivati di acidi grassi polinsaturi, differenziandosi così, nella struttura chimica, dai fitocannabinoidi.<sup>6</sup>

Tra gli endocannabinoidi sino ad ora identificati ci sono (Figura 8):

- Anandamide (N-arachidonoiletanolamide, AEA)
- 2-arachidonoilglicerolo (2-AG)
- 2-arachidonylgliceryletere (noladin etere)

- N-arachidonoil-dopamina (NADA)

Anandamide e NADA non si legano solo ai recettori cannabinoidi ma condividono con la capsaicina, un principio attivo contenuto nel pepe. Essi hanno la capacità di stimolare anche i recettori vanilloidi (TRPV1). Anandamide e 2-AG costituiscono i due primi endocannabinoidi ad essere stati isolati e per questo sono anche i più studiati fino ad ora. A causa della loro natura lipidica gli endocannabinoidi non vengono immagazzinati nelle vescicole sinaptiche come accade per altri neurotrasmettitori monoamminici, ma sono sintetizzati “on demand” (solo quando necessario) dai neuroni, in seguito alla depolarizzazione della membrana e all’aumento intracellulare dei livelli del  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>6</sup>



**Figura 8.** Strutture chimiche degli endocannabinoidi.

## *Biosintesi e catabolismo degli endocannabinoidi*

L’anandamide è stata identificata e isolata nel 1992 nel cervello di maiale (Devane et al.

individuata, in grado di legarsi selettivamente ad essi.<sup>23</sup> Si tratta di un derivato ammidico dell'acido arachidonico, componente delle membrane cellulari. Deve il suo nome alla parola Sanscrito "ananda" che significa "beatitudine".<sup>8</sup> L' Anandamide è biosintetizzata a partire da un precursore fosfolipidico di membrana, l'*N*-arachidonil-fosfatidiletanolammmina (NArPE) tramite due fasi (Figura 9,A): la prima è responsabile della formazione di NArPE per trasferimento di una porzione dell'acido Arachidonico dalla posizione sn-1 di altri fosfolipidi al gruppo amminico della fosfatidiletanolammmina.<sup>24,25</sup> Questo processo è catalizzato dall'enzima N-aciltransferasi (NAT).<sup>25</sup> Il rilascio di AEA da NArPE è catalizzato da una specifica *fosfolipasi D N-acilfosfatidil-etanolammmina* (NAPE-PLD).<sup>26</sup> Il precursore principale invece del 2-AG è il *diacil-glicerolo* (DAG<sub>s</sub>) (Figura 9,B) che deriva per la maggior parte dall'idrolisi del *fosfatidilinositolo*<sup>27</sup> ad opera della fosfolipasi C, oppure, in certe cellule, dall'idrolisi dell'*acido fosfatidico*<sup>28</sup>, catalizzata dallo stesso enzima. Gli enzimi che catalizzano tali processi sono due DAG lipasi sn-1 selettive, denominate DAGL- $\alpha$  e DAGL- $\beta$ .<sup>29</sup>

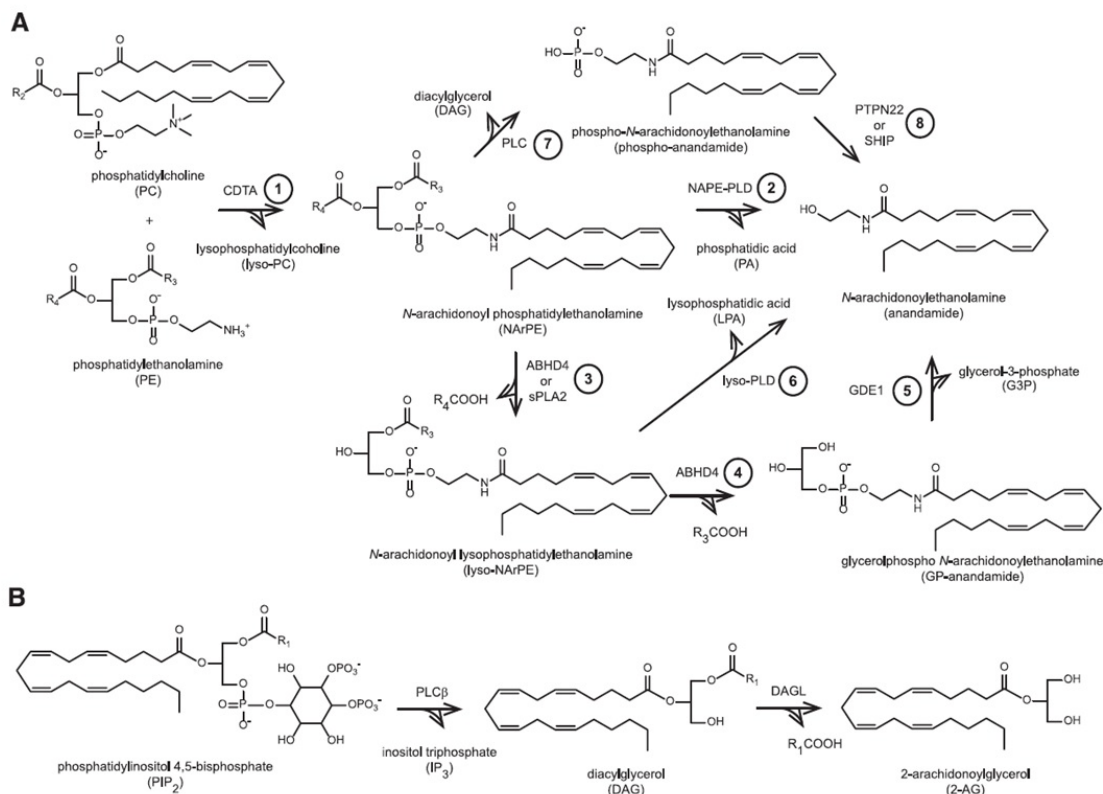


Figura 9. (A) Biosintesi Anandamide. (B) Biosintesi 2-AG



Una volta espletata la loro azione biologica, gli endocannabinoidi vengono ricaptati dalla cellula per poi essere degradati mediante idrolisi o ossidazione da parte di enzimi specifici. La degradazione di anandamide (Figura 10) avviene ad opera del FAAH o acido grasso ammidico idrolasi, un enzima di membrana intracellulare appartenente alla famiglia delle serina-idrolasi che consente di ottenere massima attività a pH 9. È ampiamente distribuito in tutto il corpo, con le concentrazioni più elevate nel cervello e nel fegato, esso idrolizza l'AEA in acido arachidonico e etanolamina.<sup>30</sup> Il FAAH, tuttavia, è in grado di riconoscere una varietà di ammidici di acidi grassi, ma il suo substrato preferito è l'anandamide.<sup>18</sup> Questo enzima è presente nei compartimenti somato-dendritici dei neuroni dei terminali postsinaptici e si esprime maggiormente nel cervelletto, ippocampo e neocorteccia ma è assente nei neuroni presinaptici. In effetti è stata proprio la sua localizzazione nei neuroni postsinaptici che ha fatto pensare nel 1998 che l'anandamide potesse funzionare come un messaggero retrogrado.<sup>31</sup> Il FAAH catalizza, in vitro, anche l'idrolisi del legame estereo dell'acido 2-AG. Tuttavia tale processo è meno importante in vivo, dato che il 2AG viene idrolizzato da un altro enzima, la monoacilglicerolo lipasi (MAGL), enzima identificato nel 1976 ed è ritenuto il principale responsabile dell'idrolisi del legame estereo del 2AG<sup>18</sup> (Figura 10). È altamente espresso sia a livello centrale nei neuroni pre-sinaptici, astrociti, e cellule gliali che a livello periferico, in diversi tessuti e nel sistema immunitario. Ulteriori enzimi di idrolisi del 2-AG sono ABHD6 e ABHD12, proteine integrali di membrana.<sup>16</sup> Sono state identificate due isoforme del FAAH: FAAH1 e FAAH2. Entrambe sono proteine integrali di membrana. FAAH1 è stato proposto per contenere un C-terminale sul fronte citoplasmatico, mentre il C-terminale di FAAH2 si affaccia sul lume. FAAH1 è stato clonato da diverse specie, tra cui topi, ratti ed esseri umani, è maggiormente espresso a livello centrale, nei testicoli, e nel piccolo intestino. Il FAAH2, al contrario, non si esprime nei roditori ed è l'isoforma predominante trovata nel tessuto cardiaco.<sup>32</sup> Inoltre, enzimi della cascata dell'acido arachidonico, come le *ciclossigenasi 2 (COX-2)* e la *lipossigenasi* ed anche enzimi del tipo citocromoP-450 possono intervenire in vie alternative di inattivazione degli endocannabinoidi.<sup>33</sup> L'ossidazione dell'anandamide catalizzata dalla COX-2, seguita

(conosciute come “prostamidi”)<sup>34</sup> che sono resistenti all'idrolisi.<sup>35</sup> Similmente il metabolismo del 2-AG ad opera di COX-2 può portare a *prostaglandin-glicerolo-esteri* (o *gliceril-prostaglandine*)<sup>36,37</sup> uno dei quali, la *gliceril-prostaglandina E<sub>2</sub>* non viene idrolizzata da FAAH o MAGL.<sup>38</sup>

L'ossigenazione di anandamide e/o 2-AG può avvenire anche in vitro, ad opera di *lipossigenasi*, a dare i corrispondenti idroperossi e idrossi-derivati.<sup>39,42</sup>

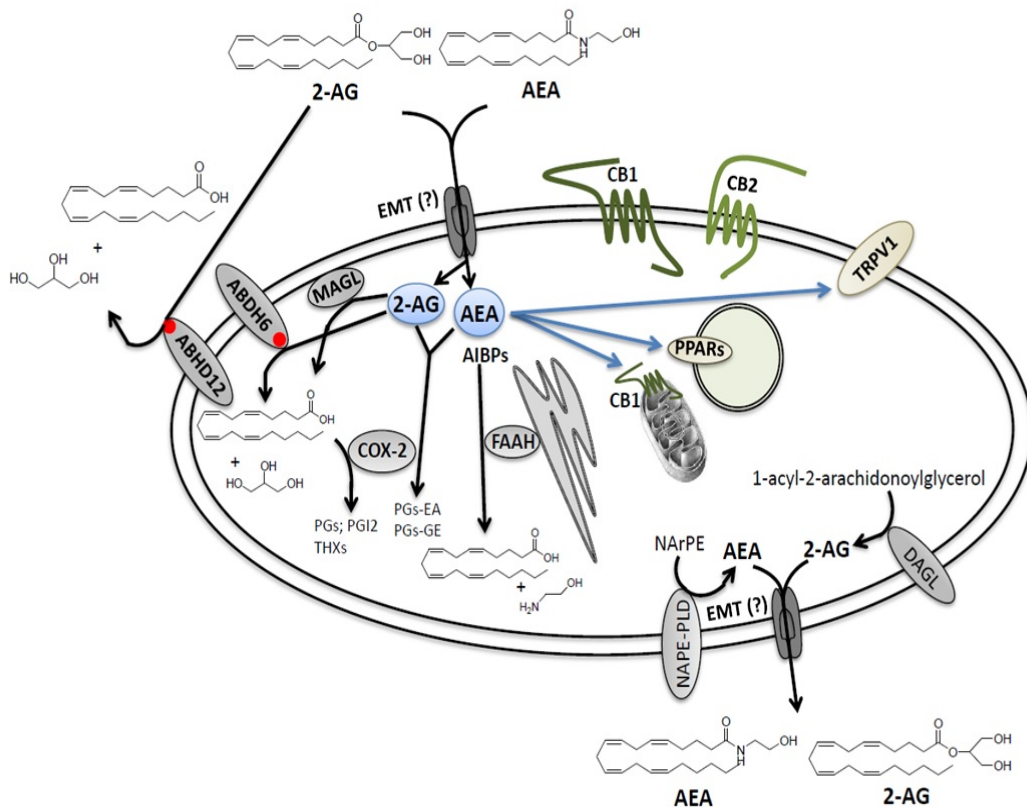


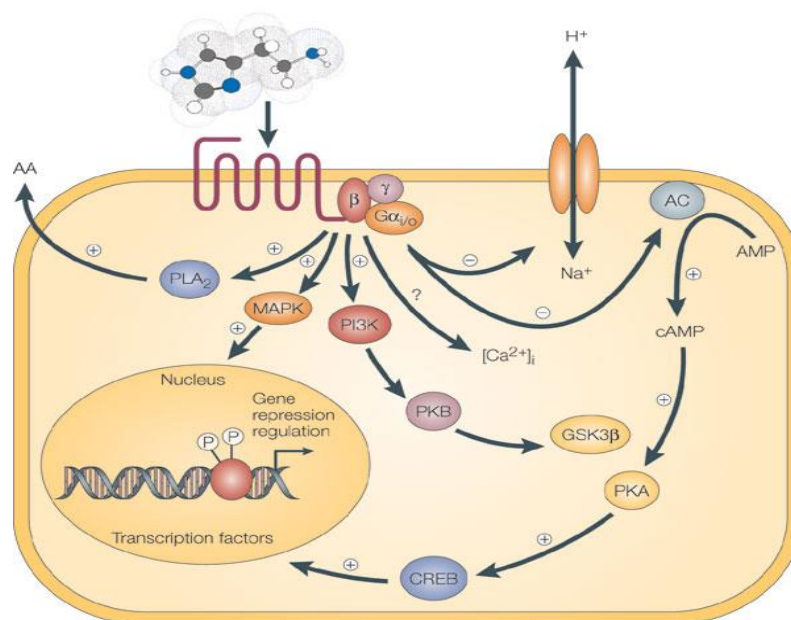
Figura 10. Immagine della degradazione degli endocannabinoidi.<sup>16</sup>

## Meccanismi di trasduzione del segnale

Una volta rilasciati, gli endocannabinoidi sintetizzati possono viaggiare in direzione

presinaptici.<sup>8</sup> Entrambi i recettori CB1 e CB2 sono principalmente accoppiati a proteine  $G_i/o$  (tramite la subunità  $\alpha$ ). Il dominio intracellulare C-terminale del recettore CB1 è importante per l'accoppiamento alla proteina G.<sup>43</sup>

La proteina G è un eterotrimerico comprendente una subunità  $\alpha$ , e un dimero beta-gamma ( $\beta\gamma$ ). In condizioni basali la subunità  $\alpha$  lega il GDP ed è ancorata al dimero  $\beta\gamma$  ma, nel momento in cui il recettore viene attivato dal ligando, si crea un'alterazione conformazionale che causa una dissociazione della subunità  $\alpha$  dal complesso  $\beta\gamma$  e un cambiamento del GDP che diviene GTP. Molti recettori accoppiati a proteine G hanno la capacità di accoppiare diversi sottotipi di  $G\alpha$ , suscitando in tal modo risposte diverse. Questo potrebbe indicare che il legame di un particolare ligando induce una conformazione GPCR che favorisce l'attivazione di uno specifico sottotipo  $G\alpha$ <sup>44</sup> (Figura 11).

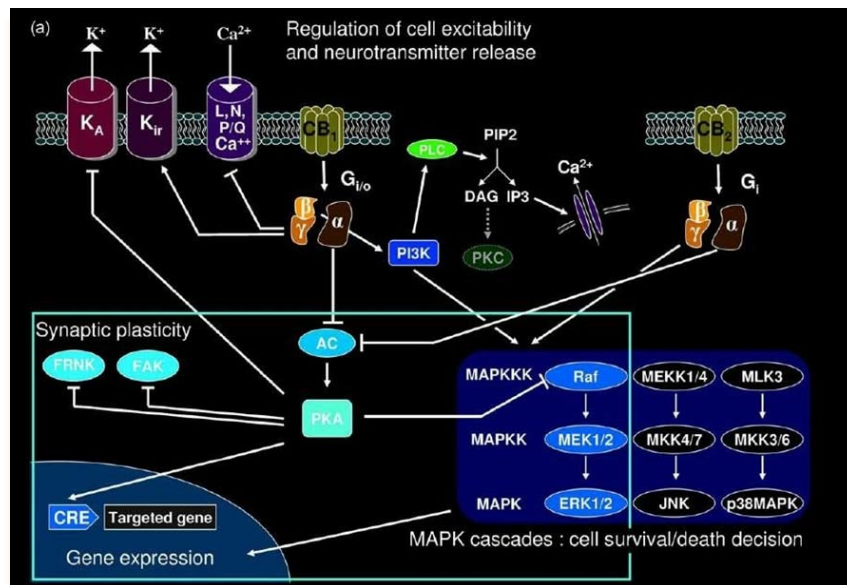


Nature Reviews | Drug Discovery

**Figura 11.** GPCRs: attivazione della subunità  $G\alpha_{i/o}$ .

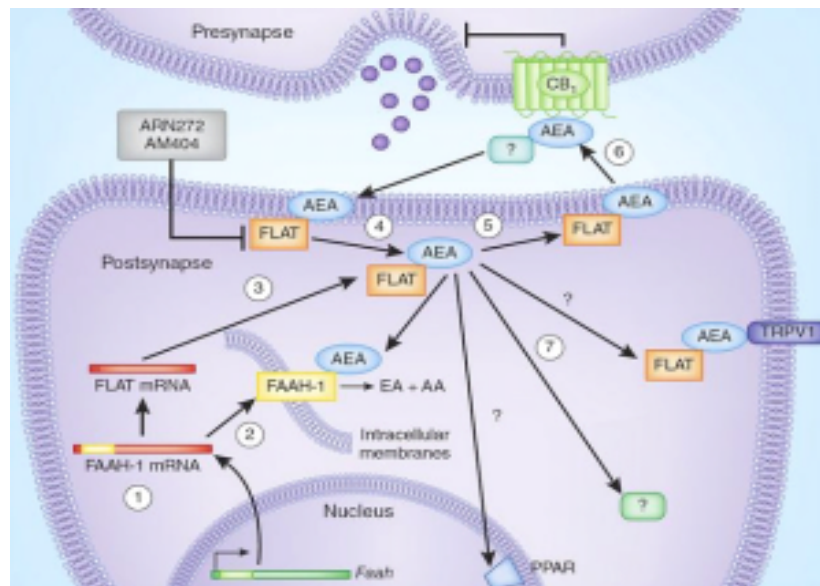
I ligandi agonisti per i recettori CB attivano molteplici vie di trasduzione del segnale principalmente attraverso l'attivazione di queste proteine G alle quali i recettori stessi sono accoppiati.

Entrambi i recettori se attivati causano l'inibizione dell'adenilato ciclasi e quindi la conversione di ATP in AMP ciclico (cAMP) con conseguente diminuzione dei livelli di quest'ultimo.<sup>19</sup> Ciò può determinare ad esempio la fosforilazione della proteina chinasi A (PKA), che a sua volta regola l'apertura dei canali del  $K^+$  di tipo A. Inoltre l'attivazione dei recettori CB causa la stimolazione delle proteine chinasi "mitogen activated" (MAPK), importante per molte funzioni cellulari come la crescita, la trasformazione e l'apoptosi<sup>43</sup> (Figura 12).



**Figura 12.** Immagine dei processi derivanti dall'attivazione dei recettori CB.<sup>16</sup>

Tipici eventi intracellulari  $G_{i/o}$ -mediati, accoppiati esclusivamente all'attivazione dei recettori CB1 (Figura 13), sono rappresentati dall'inibizione dei canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti (VGCC<sub>s</sub>) di molti tipi (incluso i canali P/Q N e L) e dalla stimolazione dei canali al  $K^+$  DI TIPO  $K_{ir}$  (inward rectifying)<sup>45-47</sup> causando una iperpolarizzazione delle membrane. L'inibizione o l'attivazione di canali ionici è una delle conseguenze principali che risulta dal legame degli endocannabinoidi ai loro recettori CB1. Recenti studi hanno dimostrato che un aumento di  $Ca^{2+}$  intracellulare causa depolarizzazione delle membrane cellulari innescando la biosintesi e il rilascio non vescicolare delle molecole degli endocannabinoidi localizzati a livello delle membrane neuronali postsinaptiche. Gli endocannabinoidi così liberati possono funzionare da messaggeri retrogradi, legandosi ai recettori CB1 presinaptici e inibendo così il rilascio di altri neurotrasmettitori (GABA, glutammato, dopamina, acetilcolina, noradrenalina).<sup>8</sup>



**Figura 13.** Il sistema endocannabinoide endogeno.

Inoltre, vi sono evidenze sempre maggiori della capacità dei CB1-agonisti (inclusi endocannabinoidi come anandamide e 2-AG) di stimolare direttamente:

1. L'idrolisi del fosfatidil-inositolo-difosfato ( $\text{PIP}_2$ ) ad opera della PLC- $\beta$  (fosfolipasi C- $\beta$ ), con il conseguente rilascio di inositolo-1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e la mobilitazione di  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico (ER), attraverso meccanismi  $\text{G}_{q/11}$ -mediati o  $\text{G}_{i/o}$ -mediati.<sup>48-51</sup>
2. La modulazione, attraverso  $\text{G}_{i/o}$ , della cascata di segnale mediata dalla fosfoinositide-3-chinasi (PI3K) che può essere di tipo positivo o negativo a seconda del tipo di cellula<sup>52-56</sup> influenzando così la successiva via Akt/protein chinasi B.

Un altro meccanismo di trasduzione del segnale descritto per entrambi i recettori CB1 e CB2 è rappresentato dal rilascio di ossido nitrico (NO)<sup>57-59</sup> con conseguente attivazione della guanilato ciclasi ed aumento dei livelli di cGMP<sup>60,61</sup>, mentre il recettore CB2 risulta accoppiato anche a un aumento del rilascio di ceramide.<sup>45</sup>

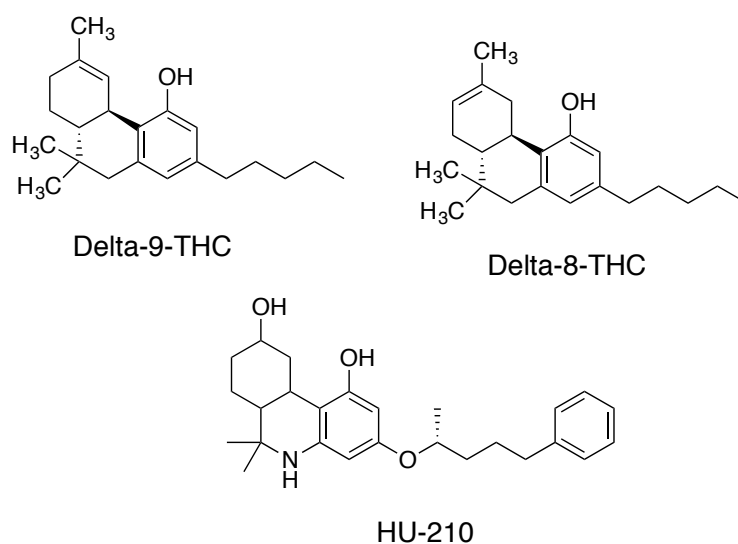
## Ligandi di sintesi dei recettori cannabinoidi

Data l'importanza fisiologica del sistema endocannabinoide sono stati sintetizzati composti in grado di attivare all'incirca con la stessa potenza dei ligandi endogeni i recettori CB1 e CB2, allo scopo di modularne l'azione. Tali composti in base alla loro attività funzionale vengono classificati come agonisti, antagonisti, agonisti inversi e modulatori allosterici. Gli agonisti legano e attivano fortemente il recettore generando una risposta biologica; mentre l'agonista inverso produce esattamente un effetto di segno opposto a quello dell'agonista. Gli antagonisti non sono in grado di indurre di per sé una risposta biologica, ma legandosi con alta affinità al recettore inibiscono l'effetto dell'agonista endogeno, che agisce attraverso lo stesso recettore. I modulatori allosterici, infine si legano a un particolare sito del recettore, chiamato appunto allosterico, e distinto da quello attivo modificandone e regolandone così l'attività.

## Agonisti dei recettori CB

Gli agonisti dei recettori CB possono essere suddivisi in 4 classi sulla base della loro struttura chimica:<sup>62,63</sup>

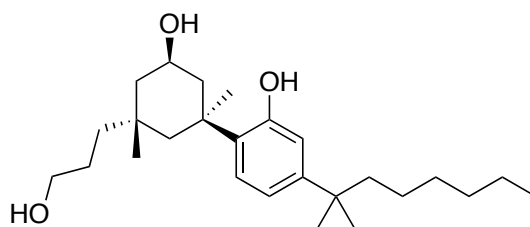
- Cannabinoidi classici (Figura 14). Sono composti dibenzopirani, sia derivati naturali che analoghi sintetici. Gli esempi più importanti sono: il  $\Delta^9$ -THC che si lega con uguale affinità ai recettori CB1 e CB2 comportandosi da agonista parziale su entrambi, anche se presenta una maggiore efficacia sul recettore CB1. Fu la prima molecola naturale estratta dalla pianta della cannabis<sup>64</sup>, dal punto di vista terapeutico si mostrò utile in chemioterapia come antiemetico, ma anche come analgesico e stimolante dell'appetito. Tuttavia, il suo uso è stato proibito a causa degli effetti indesiderati a livello centrale, come euforia e alterazione della memoria dovuti all'attivazione in particolar modo del recettore CB1.<sup>65</sup> Il  $\Delta^8$ -THC ricalca il derivato precedente per quanto riguarda l'affinità recettoriale e l'efficacia nell'attivare il recettore CB1; l'HU-210 è invece un cannabinoide particolarmente potente, i cui effetti farmacologici in vivo risultano di lunga durata (molto probabilmente a causa della presenza della catena laterale dimetileptilica, al posto di quella pentilica presente nel THC).



**Figura 14.** Struttura chimica di alcuni cannabinoidi classici.

- Cannabinoidi non classici (Figura 15). Sono analoghi biciclici o triciclici del THC, in cui

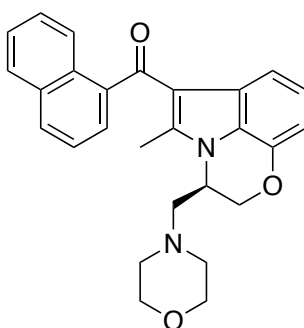
cannabinoide considerevolmente più potente del THC ed ampiamente utilizzato come riferimento nei test di laboratorio.



CP-55940

**Figura 15.** Struttura chimica di alcuni cannabinoidi non classici.

- Amminoalchilindoli (Figura 16). Il prototipo di questa classe è il WIN-55212, che in alcuni studi ha dimostrato possedere un'affinità per i recettori CB2 leggermente superiore rispetto a quella per i recettori CB1.

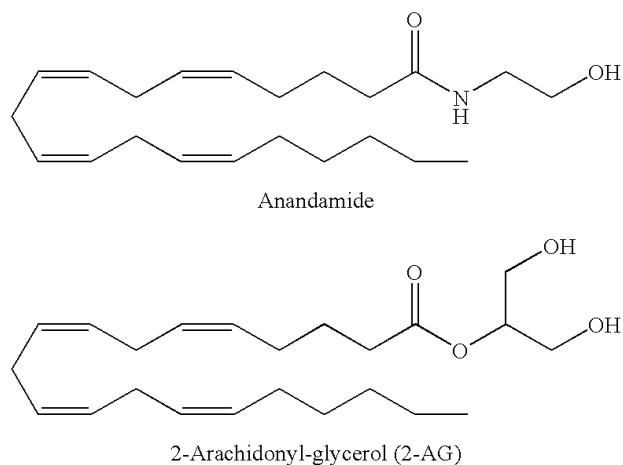


WIN-55212

**Figura 16.** Struttura chimica di un amminoalchilindoli.

- Eicosanoidi (Figura 17). I composti più studiati di questa classe sono i già citati Anandamide e 2-AG. L'anandamide ricalca il THC nel comportarsi da agonista parziale su entrambi i recettori e per il fatto che mostra un'efficacia inferiore sul recettore CB2.<sup>62</sup>



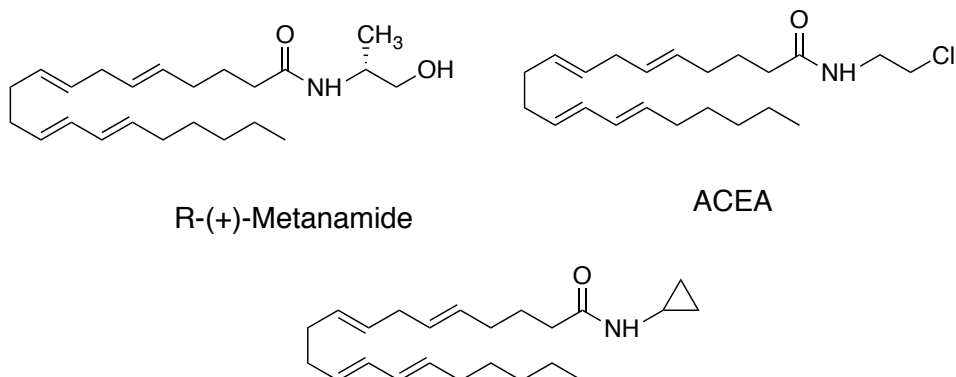


**Figura 17.** Struttura chimica di alcuni eicosanoidi.

### Agonisti CB1 selettivi

I primi agonisti CB1 selettivi sono stati sviluppati proprio a partire dall'anandamide, la cui leggera selettività per il recettore CB1 è stata significativamente incrementata inserendo un gruppo metilico sul carbonio in posizione 2, R-(+)-metanandamide (Figura 18). Inoltre, tale modifica strutturale conferisce una notevole resistenza all'azione idrolitica di FAAH, per cui la R-(+)-metanandamide e il suo ciano-analogo O-1812 possono considerarsi degli analoghi, metabolicamente stabili, dell'anandamide.

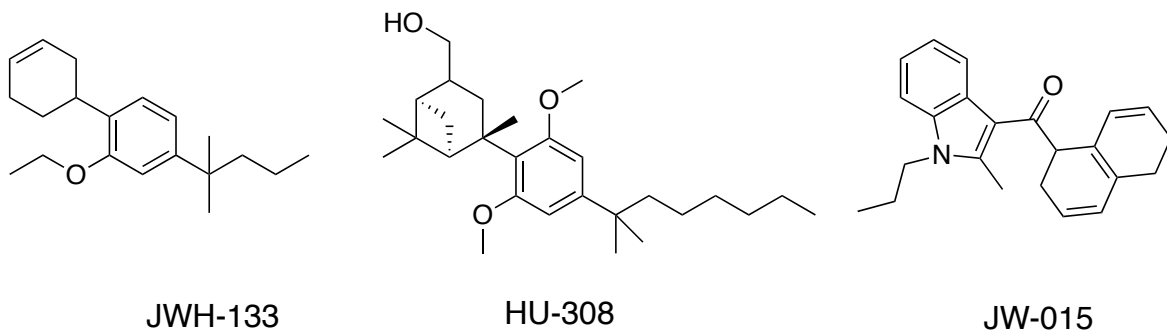
Altri agonisti CB1- selettivi con elevata efficacia, ma non resistenti alle FAAH, sono la arachidonil-2-cloroetilammina (ACEA) e la arachidonil-ciclopropilammide (ACPA).



**Figura 18.** Struttura chimica di alcuni agonisti CB1 selettivi.

### Agonisti CB2 selettivi

Di questa classe ne fanno parte (Figura 19) JWH-133, un cannabinoide classico, HU-308, un cannabinoide non classico, JWH-015 un amminoalchilindolo.



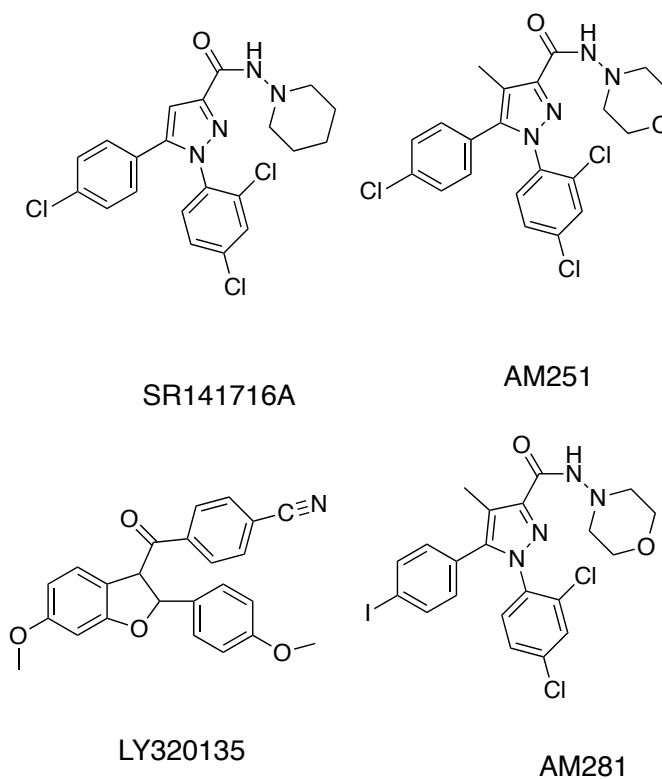
**Figura 19.** Struttura chimica di alcuni agonisti CB2 selettivi.

### Antagonisti/ Agonisti inversi CB1 selettivi

Il principale composto di questa classe è il diarilpirazolo (Figura 20) SR14176A (Rimonabant). Esso blocca l'azione di vari agonisti dei cannabinoidi in vivo. Altri composti sono AM251, AM281, LY320135, essi possono tutti a bloccare l'attivazione dei recettori cannabinoidi CB1 agonista-indotta in modo competitivo. Alcuni di essi sono già stati impiegati in terapia come agenti anti-obesità o per il trattamento di disordini metabolici (dislipidemia, diabete di tipo II), sebbene il loro uso è stato successivamente proibito a causa degli effetti collaterali psichiatrici (ansia e depressione). Altri possibili usi terapeutici potrebbero includere:

cocaina, schizofrenia, osteoporosi, morbo di Parkinson, malattia di Alzheimer. Sono in corso ulteriori studi allo scopo di sviluppare antagonisti/agonisti inversi CB1 selettivi che siano incapaci di entrare nel cervello e quindi potenzialmente privi degli effetti indesiderati centrali ma ancora utili per il trattamento dei disordini metabolici.<sup>66</sup>

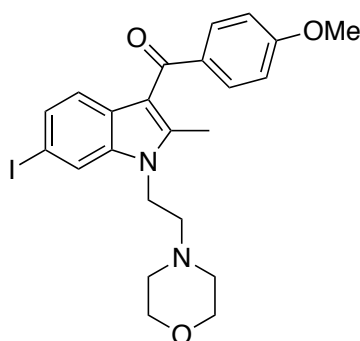
Alcuni antagonisti competitivi dei recettori CB1 sono stati sviluppati in modo da essere sprovvisti di qualsiasi capacità rilevabile nell'indurre segni di agonismo inverso a livello dei recettori CB1 quando somministrati da soli. Un esempio di un antagonista, detto antagonista "neutro" è NESS O327, esso è un analogo strutturale di Rimonabant e presenta un'affinità nettamente maggiore sui CB1 rispetto ai CB2. Questi composti possono essere più utili come "strumenti" farmacologici, rispetto agli agonisti inversi, in quanto producono effetti solo in presenza di elevati livelli di endocannabinoidi.



**Figura 20.** Struttura chimica di alcuni antagonisti/agonisti inversi CB1 selettivi.

## Antagonisti/ Agonisti inversi CB2 selettivi

Tra i composti più potenti che bloccano i recettori CB2 rispetto ai CB1 c'è AM630 (Figura 21). Questo composto è considerato un agonista inverso piuttosto che antagonista neutro dei recettori CB2, perché quando somministrati da soli, possono produrre effetti cannabinomimetici inversi nei tessuti che esprimono i recettori CB2.<sup>63</sup>



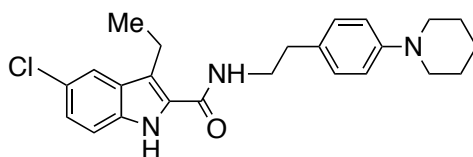
AM630

**Figura 21.** Struttura chimica di un antagonista/agonista inverso CB2 selettivi.

## Modulatori allosterici dei recettori CB1

I modulatori allosterici sono composti che legandosi al sito allosterico del recettore alterano le proprietà di segnalazione del recettore stesso e del ligando ortosterico, modificandone l'affinità di legame, l'efficacia e potenza funzionale. Rientrano in questa categoria:

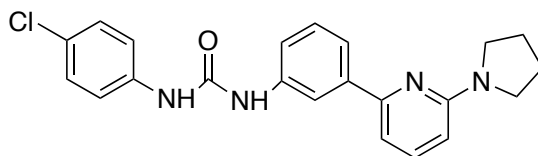
- Derivati indolici: tra cui *Org27569* (Figura 22) che è stato il primo composto con tali proprietà ad essere identificato.<sup>67</sup>



Org27569

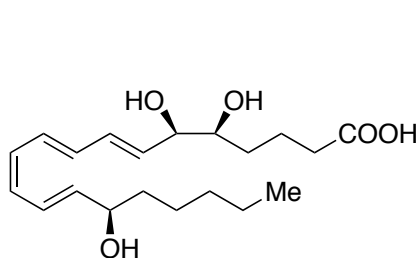
**Figura 22.** Struttura chimica di Org27569.

- Derivati ureici: tra cui *PSNCBAM-1* (Figura 23) che si comporta come un antagonista allosterico nei saggi con AMPc.<sup>67</sup>

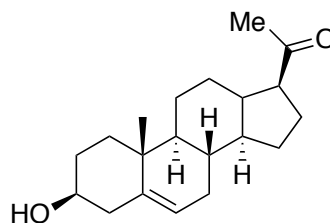


**Figura 23.** Struttura chimica di PSNCBAM-1.

- Modulatori allosterici endogeni del recettore CB1: (Figura 24) tra cui *Lipoxin A4* coinvolto nella regolazione del sistema immunitario e potente mediatore endogeno anti-infiammatorio; *Pregnenolone* sintetizzato invece direttamente dal colesterolo.<sup>67</sup>

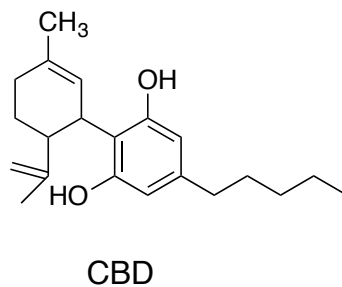


Lipoxin A4



Pregnenolone

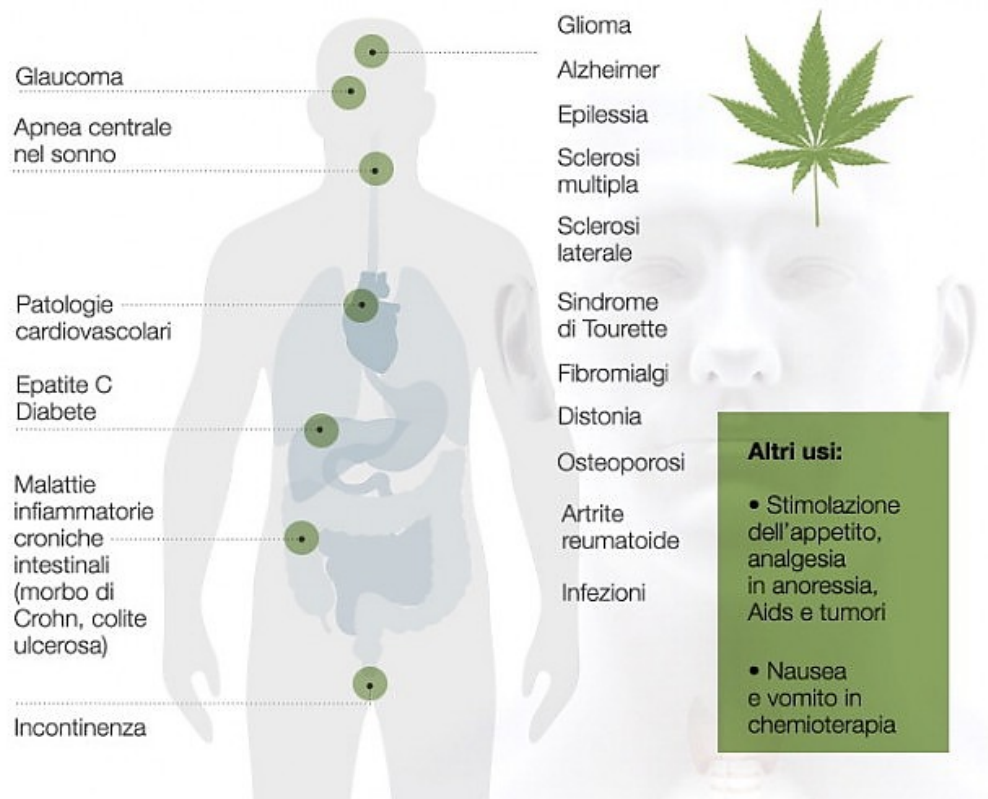
- Modulatori allosterici misti del recettore CB1: appartiene a questa classe il *Cannabidiolo (CBD)* che si comporta sia come un agonista dei recettori CB2 che come un NAM nei confronti dei CB1 (Figura 25).<sup>67</sup>



**Figura 25.** Struttura chimica del CBD.

## Usi terapeutici

I cannabinoidi sono noti soprattutto per i loro effetti sulle funzioni del sistema nervoso centrale. Essi producono euforia, alterazioni nella cognizione, analgesia, hanno proprietà anticonvulsivanti, regolano la temperatura corporea, il sonno e l'appetito<sup>68</sup> (Figura 26). Tuttavia, i cannabinoidi possiedono anche attività immunomodulante e antiinfiammatoria. Molte malattie del sistema nervoso centrale tra cui il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi multipla e la demenza coinvolgono processi infiammatori, causando una sovraespressione di citochine e altri mediatori dell'infiammazione nel sistema nervoso centrale. Pertanto i cannabinoidi possono essere dei potenziali agenti terapeutici coinvolti nelle malattie neurologiche.



**Figura 26.** Coinvolgimento del SE in alcune condizioni fisiopatologiche.

## **Ruolo dei recettori CB nella Neuroprotezione**

Evidenze sperimentali hanno suggerito un ruolo dei recettori CB nella Neuroprotezione. La barriera emato-encefalica (BEE) è un importante struttura del cervello, essenziale per la neuroprotezione. È stato visto che la BEE e i cannabinoidi condividono gli stessi meccanismi di neuroprotezione: i recettori CB1 proteggono dall'eccitotossicità e dalla morte cellulare, i recettori CB2 dall'infiammazione, quindi da tutti quei processi che danneggiano anche la BEE. I recettori CB hanno dimostrato di migliorare l'integrità della BEE, in particolare ripristinando la tenuta delle giunzioni strette, ma c'è ancora molta incertezza circa le cascate di segnalazione sottostanti. Il meccanismo più studiato di neuroprotezione coinvolge gli effetti antiinfiammatori del recettore CB2 che protegge il cervello impedendone la neuroinfiammazione; mentre il recettore CB1 è stato implicato nella protezione contro la morte cellulare indotta da una sovrastimolazione eccitatoria di recettori, accompagnata dal

## Effetti anti-emetici

La chemioterapia può indurre nausea e vomito, il trattamento inefficace di questi effetti collaterali hanno spinto gli oncologi, alla fine del 1970 ad approfondire le proprietà antiemetiche dei cannabinoidi.<sup>71</sup> Il primo agonista cannabinoide, Nabilone (Cesamet), che è un analogo del  $\Delta^9$ -THC venne autorizzato nel 1981 per la soppressione della nausea e del vomito indotti da chemioterapia. Più tardi, anche Dronabinol (sintetico del  $\Delta^9$ -THC) è entrato in commercio, come Marinol, con effetti antiemetici.

## Stimolazione dell'appetito

Pazienti che soffrono di fasi avanzate di infezione da cancro o HIV subiscono spesso una grave perdita di peso e appetito. Inoltre, in caso di AIDS e cachessia (perdita di peso estremo) questo può essere accompagnato da diarrea cronica e debolezza.<sup>72</sup> Studi controllati hanno dimostrato che il THC somministrato per via orale stimola l'appetito e rallenta la perdita di peso cronica nei pazienti con tumori e AIDS. Si è visto che il trattamento con Dronabinol tendeva a stabilizzare il peso. Marinol è stato infatti autorizzato come stimolante dell'appetito nel 1992.

## Obesità

Il recettore CB1 sembra regolare l'attività dei neuroni dopaminergici nel sistema mesolimbico, provocando la modulazione dei comportamenti edonistici mediati dalla dopamina; interagisce, inoltre, con neuropeptidi come la melanocortina e peptidi intestinali come la grelina che stimola l'assunzione di cibo.<sup>73</sup> È stato documentato che l'antagonismo farmacologico selettivo del recettore CB1 migliora le "anomalie" dei lipidi associati all'obesità. Dopo il buon risultato ottenuto in vari studi clinici, il più noto bloccante CB1, SR141617A, anche chiamato Rimonabant (commercialmente noto come Acomplia) è stato approvato in Europa nel 2006 per il trattamento dell'obesità, mentre non ha ricevuto



positivi sul peso corporeo, l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) nel 2008 ha raccomandato la sospensione di Rimonabant a causa degli effetti avversi riscontrati in pazienti che ne fanno uso, come una maggiore incidenza al suicidio e di depressione.<sup>74</sup> Rimonabant rimane comunque uno strumento sperimentale estremamente prezioso. Quindi, c'è un urgente bisogno di una nuova strategia che condivida l'efficacia riconosciuta del Rimonabant contro l'obesità, il diabete di tipo II e nei fattori di rischio cardiometabolici, ma non la sua apparente capacità di produrre segni di ansia, depressione e tendenze suicide in alcuni pazienti. Una possibile soluzione a questo problema, che è attualmente oggetto di studi, potrebbe essere quella di usare un *Modulatore Allosterico Negativo* che blocca selettivamente le azioni mediate del recettore CB1 di uno solo degli endocannabinoidi. Così facendo si andrebbero ad eliminare gli effetti psicotropi negativi derivanti dall'attivazione del recettore CB1.

### *Dolore neuropatico*

È una forma debilitante di dolore cronico resistente al trattamento, causata da un danno al sistema nervoso. Esso può derivare da lesioni dei nervi periferici, da stati di malattia come il diabete, dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e dalla sclerosi multipla. Il dolore neuropatico rimane un importante problema clinico perché risponde poco alle terapie disponibili. I cannabinoidi sono stati valutati in studi clinici per la soppressione del dolore acuto postoperatorio e neuropatico.<sup>75</sup>

In Italia il primo farmaco a base di cannabinoidi approvato è stato il **Sativex** per il trattamento della spasticità muscolare causata da sclerosi multipla nei pazienti che non avevano riscontrato benefici da altri trattamenti per la spasticità o avevano riportato eccessivi effetti collaterali. Sativex è uno spray sub-linguale contenente quantità uguali di THC e CBD, in cui CBD ha lo scopo di ridurre il metabolismo del THC prolungandone di conseguenza l'emivita.